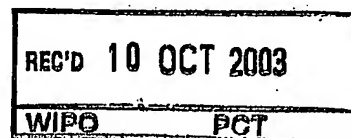


日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 8月23日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-243923  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2002-243923]

出願人 旭メディカル株式会社  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

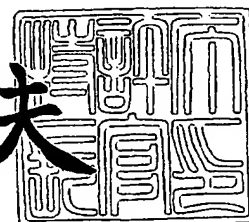
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年 9月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 A21540A  
【提出日】 平成14年 8月23日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都千代田区神田美土代町 9 番地 1 旭メディカル株式会社内  
【氏名】 徳島 恭雄  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都千代田区神田美土代町 9 番地 1 旭メディカル株式会社内  
【氏名】 北口 暢哉  
【特許出願人】  
【識別番号】 000116806  
【氏名又は名称】 旭メディカル株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 110000109  
【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
【代表者】 今村 正純  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 170347  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フィブリン含有生物学的足場材

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フィブリンノーゲン回収率が15%~32%の範囲になるように血漿から沈澱させて得られたフィブリンノーゲン濃縮物と、フィブリンノーゲン活性化物質との混合物を含む、フィブリン含有生物学的足場材。

【請求項2】 前記フィブリンノーゲン濃縮物が、血漿を短時間冷却工程、急速解凍工程、及びフィブリンノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得られたものである、請求項1に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

【請求項3】 前記フィブリンノーゲン濃縮物が、血漿を10分~60分間の冷却工程、15分~60分間の解凍工程、及びフィブリンノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得られたものである、請求項1又は2に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

【請求項4】 冷却工程を-20℃から-40℃で行い、解凍工程を-10℃~+15℃で行う、請求項2又は3に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

【請求項5】 血管内皮細胞を72時間培養した場合に該細胞数を4倍以上に増加させることができる血管内皮細胞増殖活性を有する、請求項1から4のいずれかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

【請求項6】 フィブリンノーゲン活性化物質がトロンビンである、請求項1から5のいずれかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

【請求項7】 前記トロンビンがフィブリンノーゲンと同一人の血液から得られたものである、請求項6に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

【請求項8】 血管内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、骨髓由来間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、及び脾細胞からなる群から選ばれる細胞の培養のために使用する、請求項1から7のいずれかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

【請求項9】 請求項1から8のいずれかに記載の生物学的足場材を用いて細胞を培養する工程を含む、細胞培養又は組織再生のための方法。

【請求項10】 前記細胞が、血管内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、骨髓

由来間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、及び脾細胞からなる群から選ばれる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記細胞が、フィブリノーゲン濃縮物の原料とした血漿を採取した人と同一人に由来する、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】 細胞増殖・分化刺激物質の存在下で培養を行うことを特徴とする、請求項 9 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】 前記細胞増殖・分化刺激物質が、血小板から放出される物質である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 前記血小板から放出される物質が、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、かつ白血球を吸着する第 1 段フィルターに全血を通し、フィルターからの通過画分を得る工程；

(2) (1) で得られた通過画分を、血小板を吸着し、赤血球を通過させる第 2 段フィルターに通し、血小板が吸着したフィルターを得る工程；

(3) (2) で得られたフィルターに、血小板活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】 前記血小板から放出される物質が、ATP、ADP、コラーゲン、及びトロンビンから成る群から選ばれる少なくとも 1 つの物質である、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 16】 前記細胞増殖・分化刺激物質が、白血球から放出される物質である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】 前記白血球から放出される物質が、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第 1 段フィルターに全血を通し、白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化白血球物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】 前記細胞増殖・分化刺激物質が、血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物である請求項 12 に記載の方法。

【請求項 19】 前記血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物が、下記の工程：

(1) 赤血球と血漿を通過させ、血小板と白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、血小板と白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、血小板活性化物質と白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質と活性化白血球放出物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】 細胞が、人由来の細胞をフィルターに通すことによって得られたものである、請求項 9 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】 フィブリノーゲン濃縮物の原料である血漿が、人血液をフィルターに通すことによって得られたものである、請求項 9 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】 請求項 9 から 21 のいずれかに記載の方法によって得られる、足場材に担持された細胞培養物又は再生組織。

【請求項 23】 請求項 22 に記載の細胞培養物又は再生組織を、損傷を受けた組織に塗布又は移植片として用いる、組織再生促進方法。

【請求項 24】 請求項 1 から 8 のいずれかに記載の生物学的足場材と細胞を混合した混合物を、損傷を受けた組織に添加する工程を含む、組織再生促進方法。

【請求項 25】 前記細胞が、血管内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、骨髓由来間葉系細胞、肝臓細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、脾細胞からなる群から選ばれる少なくとも一つの細胞である、請求項 24 に記載の組織再生促進方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血漿から調製したフィブリノーゲン濃縮物とフィブリノーゲン活性化物質との混合物を含む生物学的足場材、ならびに該生物学的足場材の利用に関

する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

近年、従来から行われてきた臓器移植や人工臓器を用いる治療法にとって代わる方法として、再生医療に大きな期待が寄せられている。再生医療の研究は、骨髄移植のような細胞の補充による細胞・組織の再生を目指した研究と、狭義の組織工学 (Tissue engineering) という概念で捉えられる一連の研究という2つの方向性で発展してきた。狭義の組織工学とは、細胞が生体内で生着する際に必要な足場 (scaffolds) と細胞の両方を用いて修復しようとする研究である。再生医学には「細胞」、「細胞の増殖・分化のための足場」、及び「細胞増殖因子」が必要である。これまで足場となる材料には、生体に害を与えないための生体親和性、新しい生体組織の形成と共に材料が分解/吸収されるための生体吸収性が要求されることから生物学的材料が望まれている。

#### 【0003】

フィブリン糊は、生理的な血液凝固作用を利用して、組織の接着、閉鎖及びそれに続く創傷治療を行うための外用接着剤であり、現在各種外科手術に広く用いられている。フィブリン糊はまた再生医療分野において生物学的足場に用いる技術も多数知られている (Cell Transplantation, 7, 309-317, 1998; Burn, 24, 621-630, 1998等)。

#### 【0004】

従来からフィブリン糊は、アレルギー反応やショック等の免疫反応等の副作用を避けるため、自己血漿から調製したクリオプレシピテート (自家クリオ) を使用することが行われている。これまで自己血フィブリン糊の製造方法として以下のような方法が知られている。

#### 【0005】

例えば、Casaliらの方法は、長時間冷凍、緩速解凍後、遠心分離を行い、全血からフィブリン糊を調製するのに約30時間かかるという方法である (Casali et al., Transmission, 32, 641-643, 1992; 以下、本明細書において本方法を「クリオ法」という)。

## 【0006】

その概略を説明すると、まず、全血を採取し、この全血を遠心分離(1,000g×15分、4℃)して血漿成分を分離する。次に、遠心分離により得られた血漿成分を超低温フリーザーに移し、-80℃にて18時間静置して凍結させる、次に凍結状態の血漿成分を約4℃の冷蔵庫に入れて、16時間かけて緩速解凍する。このような凍結及び解凍処理を血漿成分に施すと、血漿成分中にクリオプレシピテート(フィブリノーゲン/第13因子)が析出する。次に冷却遠心機にて1000×gで15分程度の遠心分離を行う(4℃)。解凍後、さらに再び4℃にて1000×gで15分程度の遠心分離を行い、沈澱物を回収し、フィブリノーゲン濃縮物とする。一回目の解凍、遠心後に得た沈澱物を乱さぬように注意しながら、上記条件に従って再度凍結及び解凍を繰り返す場合もある(ダブルクリオ法)。

## 【0007】

別の方法として、Kjaergardによるエタノール沈澱法がある(Kjaergard, Surg Gynecol Obstet, 175(1), July, 1992: 以下、本明細書において本方法を「エタノール法」という)。この方法は、全血から得られた血漿を氷水上でエタノールを添加してフィブリノーゲンを沈澱させる方法である。

## 【0008】

上記のクリオ法又はエタノール法で得られたフィブリノーゲンを用いたフィブリン糊は、再生医療などの生物学的足場材として使用されている。例えば、エタノール法によって得られたフィブリノーゲンで調製したフィブリンゲル内に繊維芽細胞を包埋し、その上に上皮細胞を播種することにより、人工皮膚を作製する技術(特開平10-277143号)、エタノール法によって得られたフィブリノーゲンで調製したフィブリンゲルで生物学的足場材(支持体)を作製し、その上で角化細胞培養物を作製し、移植用表皮細胞層とする技術、繊維芽細胞と角化細胞により移植用真皮細胞層とする技術(特許第3134079号)等が知られている。また、クリオ法とエタノール法で得られたフィブリノーゲンを用いてフィブリン培養を行い、軟骨細胞の細胞増殖及び代謝能の比較検討を行った結果、クリオ法の方が軟骨細胞の形態維持、細胞増殖、プロテオグリカン蓄積がより支持されるという報告がある(American Journal of Veterinary Research, 59, 514-520, 1998)

## 【0009】

また、上記クリオ法を改良し、短時間冷凍、急速解凍を行い、1～2時間という短時間でフィブリノーゲンを得る方法が知られている（特表2001-513073号等：以下、本明細書において本方法を「改良クリオ法」という）。同種角膜上皮幹細胞を、血漿を原料として上記の改良クリオ法で作製したフィブリンゲル内で培養し、目の表面組織置換体（角膜置換体）を作製するという報告があるが（Cornea 21(5):505-510, 2002. Bin Han他）、この論文では、細胞とフィブリン足場材は同一人由来のものではなく、また足場材としての性能を他法と比較したものでもない。

## 【0010】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、再生医療分野において細胞増殖・分化を行うのに適した性能のよい足場材を提供することにある。

## 【0011】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく種々の検討を行った結果、短時間冷凍及び急速解凍による方法（改良クリオ法）で得られたフィブリノーゲン濃縮物が、他の方法で得られたフィブリノーゲン濃縮物よりも再生医療の足場材としての性能が優れていることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

## 【0012】

すなわち、本発明は、フィブリノーゲン回収率が15%～32%の範囲になるように血漿から沈澱させて得られたフィブリノーゲン濃縮物と、フィブリノーゲン活性化物質との混合物を含む、フィブリン含有生物学的足場材を提供するものである。

## 【0013】

好ましくは、前記フィブリノーゲン濃縮物は、血漿を短時間冷却工程、急速解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程（例えば、遠心分離工程）



を含む方法によって得られたものである。

好ましくは、前記フィブリノーゲン濃縮物は、血漿を10分～60分間の冷却工程、15分～60分間の解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程（例えば、遠心分離工程）を含む方法によって得られたものである。

好ましくは、冷却工程を $-20^{\circ}\text{C}$ から $-40^{\circ}\text{C}$ で行い、解凍工程を $-10^{\circ}\text{C}$ ～ $+15^{\circ}\text{C}$ で行う。

#### 【0014】

好ましくは、本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、血管内皮細胞を72時間培養した場合に該細胞数を4倍以上に増加させることができる血管内皮細胞増殖活性を有する。

#### 【0015】

好ましくは、フィブリノーゲン活性化物質はトロンビンである。

好ましくは、前記トロンビンがフィブリノーゲンと同一人の血液から得られたものである。

好ましくは、本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、血管内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、骨髓由来間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、及び脾細胞からなる群から選ばれる細胞の培養のために使用することができる。

#### 【0016】

本発明の別の側面によれば、上記した本発明の生物学的足場材を用いて細胞を培養する工程を含む、細胞培養又は組織再生のための方法が提供される。

好ましくは、前記細胞は、血管内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、骨髓由来間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、及び脾細胞からなる群から選ばれる細胞である。

好ましくは、前記細胞は、フィブリノーゲン濃縮物の原料とした血漿を採取した人と同一人に由来する。

#### 【0017】

好ましくは、本発明による細胞培養又は組織再生のための方法は、細胞増殖・分化刺激物質の存在下で培養を行うことができる。

好ましくは、前記細胞増殖・分化刺激物質は、血小板から放出される物質である。

#### 【0018】

好ましくは、前記血小板から放出される物質は、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、かつ白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、フィルターからの通過画分を得る工程；

(2) (1) で得られた通過画分を、血小板を吸着し、赤血球を通過させる第2段フィルターに通し、血小板が吸着したフィルターを得る工程；

(3) (2) で得られたフィルターに、血小板活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られる。

好ましくは、前記血小板から放出される物質は、ATP、ADP、コラーゲン、及びトロンビンから成る群から選ばれる少なくとも1つの物質である。

#### 【0019】

好ましくは、前記細胞増殖・分化刺激物質は、白血球から放出される物質である。

好ましくは、前記白血球から放出される物質は、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化白血球物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られる。

#### 【0020】

好ましくは、前記細胞増殖・分化刺激物質は、血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物である。

好ましくは、前記血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物は、下記の工程：

(1) 赤血球と血漿を通過させ、血小板と白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、血小板と白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、血小板活性化物質と白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質と活性化白血球放出物質の含有液を得る工程;

を含む方法によって得られる。

#### 【0021】

好ましくは、細胞は、人由来の細胞をフィルターに通すことによって得られたものである。

好ましくは、フィブリノーゲン濃縮物の原料である血漿は、人血液をフィルターに通すことによって得られたものである。

#### 【0022】

本発明のさらに別の側面によれば、上記したいずれかの方法によって得られる、足場材に担持された細胞培養物又は再生組織が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の細胞培養物又は再生組織を、損傷を受けた組織に塗布又は移植片として用いる、組織再生促進方法が提供される。

#### 【0023】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の生物学的足場材と細胞を混合した混合物を、損傷を受けた組織に添加する工程を含む、組織再生促進方法が提供される。

好ましくは、前記細胞は、血管内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、骨髓由来間葉系細胞、肝臓細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、脾細胞からなる群から選ばれる少なくとも一つの細胞である。

#### 【0024】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、フィブリノーゲン回収率が15%~32%の範囲になるように血漿から沈澱させて得られたフィブリノーゲン濃縮物を含む。

#### 【0025】

本明細書において、「フィブリノーゲン回収率」とは、下記式によって得るこ

とができる値をいう。

フィブリノーゲン回収率=(フィブリノーゲン濃縮物中に含まれるフィブリノーゲン量/フィブリノーゲン濃縮物の調製に用いる出発物質である血漿中に含まれるフィブリノーゲン量)×100

#### 【0026】

上記の「フィブリノーゲン濃縮物」は、血漿を短時間冷却工程、急速解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程（例えば、遠心分離工程）を含む方法によって得ることができる。

具体的には、上記の「フィブリノーゲン濃縮物」は、血漿を10分～60分間の冷却工程、15分～60分間の解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得ることができる。また、好ましくは、冷却工程は-20℃から-40℃で行い、解凍工程は-10℃～+15℃で行うことができる。原料となる血漿は、生体適合性の点から、ヒトを対象とする場合はヒトの血漿を用い、また動物を対象とする場合はその動物の血漿を用いることが好ましい。

#### 【0027】

上記フィブリノーゲン濃縮物を得るための手法のより具体的な態様は以下の通りである。まず、全血を遠心分離(4℃)して得た血漿を、-30℃程度の低温で30分間静置して凍結させ、次に、-2.5℃で30分間放置し、続いて、12℃で30分間放置する。続いて、4℃で30分間放置し、最後に遠心分離(1,000g×15分、1℃)して上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得ることができる。あるいは別法としては、全血を遠心分離(1000g×15分、4℃)して得た血漿を、-30℃程度の低温で60分間静置して凍結させた後、-5℃で30分間放置し、その後、4℃で30分間放置する。最後に遠心分離(1,000g×15分、1℃)して上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得ることができる。

なお、遠心分離操作以外にも、デカンテーションやろ過等でフィブリノーゲン濃縮物を得ることも可能であるので、本発明は遠心分離操作に限定されるものではない。

これらの方法は、フィブリノーゲン濃縮物を血漿から1～2時間という短時間

で得る方法であり（特表2001-513073号参照）、本明細書において、「改良クリオ法」と呼ぶ。

#### 【0028】

フィブリノーゲンの定量は、試料にトロンビンと $\text{Ca}^{2+}$ を加え、フィブリンクロットの生成時間を測定するトロンビン時間法、生成クロットを秤量する重量法、抗フィブリノーゲン抗体を用いる免疫学的測定法等のいずれでもよいが、操作の簡便性の点から、免疫学的測定法で行うことが好ましい。

#### 【0029】

上記で得られるフィブリノーゲン濃縮物を用いて調製したフィブリン含有生物学的足場材は、それを用いて血管内皮細胞を72時間培養した場合に該細胞数を4倍以上、さらに好ましくは6倍以上に増加させることができる血管内皮細胞増殖活性を有する。血管内皮細胞増殖活性の上限は特に限定されず、可能な限り高い活性を有するものを好ましく使用することができるが、一般的には50倍以下であり、通常は20倍以下であり、さらに通常は15倍以下程度である。

#### 【0030】

本発明のフィブリン含有生物学的足場材はまた、フィブリノーゲン活性化物質を含む。「フィブリノーゲン活性化物質」とは、フィブリノーゲンをフィブリンへ変換する作用を有する物質をいい、具体的にはトロンビンが挙げられる。

トロンビンとしては、通常トロンビンとしての生物活性を有するもの、例えば血漿蛋白を分画して得られるもの等が使用できる。例えばヒト又はウシの血漿から、好ましくはフィブリノーゲン濃縮物の調製に用いる血漿と同一人のヒト血漿から精製したプロトロンビンに、 $\text{Ca}^{2+}$ の存在下でトロンボプラスチンを作用させて調製したものをを用いることができる。あるいは、市販の薬局方収載品を用いてもよい。

#### 【0031】

足場材におけるトロンビンの配合量は、フィブリノーゲン濃縮物1mgに対し、0.01～100単位、好ましくは0.1～10単位とすればよい。

#### 【0032】

本発明のフィブリン含有生物学的足場材には、フィブリンの形成と安定化に関

与する血漿由来の物質が含まれている。フィブリンの形成と安定化に關与する血漿由来の物質としては、ファクターXIII、フィブロネクチン等が挙げられる。

#### 【0033】

本發明のフィブリン含有生物学的足場材は皮膚、軟骨、骨、肝臓、腎臓及び角膜等の再生医療に用いる細胞の培養に好適に用いることができる。細胞としては、例えば、ヒト由来の幹細胞（特に、骨髓由来間葉系幹細胞）、内皮細胞、上皮細胞、実質細胞（特に、肝実質細胞）、線維芽細胞、角化細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞等が挙げられる。

#### 【0034】

本發明のフィブリン含有生物学的足場材を用いて上記の細胞を培養する方法について述べる。細胞培養の方法としては特に制限はないが、足場材に細胞と培地の混合物を加え、所定雰囲気下、所定温度で放置する方法等を用いることができる。

#### 【0035】

培地は、特に制限はなく、血清培地及び無血清培地のいずれもが使用可能である。血清培地としては、MEM培地、BME培地、DME培地、 $\alpha$ MEM培地、IMEM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地及びRPMI培地等の基礎培地に血清を加えたもの等が挙げられる。

#### 【0036】

細胞培養の雰囲気については、特に制限はなく、例えば、二酸化炭素と空気の混合物等の雰囲気が使用できる。細胞培養の培養温度は、細胞の増殖・分化が活発に行えるという点で、10～50℃が好ましく、30～40℃が特に好ましい。以上の方法に従って得られた培養物を足場材から剥離させ、回収するための方法としては、周囲温度又は足場材の温度を下げる方法、培地を低温の培地に交換する方法、EDTA等のキレート剤の添加、トリプシン又はコラゲナーゼ等の酵素処理による方法、セルスクレーパーによる機械的な剥離による方法などが挙げられる。

#### 【0037】

また、上記の細胞培養は、細胞増殖・分化刺激物質の存在下で培養を行っても

よい。細胞増殖・分化刺激物質としては、下記の手法にて得られる血小板から放出される物質、白血球から放出される物質、及びこれらの混合物等が好適である。あるいは、細胞増殖・分化刺激物質として通常再生医療分野で用いられている、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インシュリン様増殖因子、肝細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子、結合組織成長因子等の細胞増殖因子等を使用してもよい。

#### 【0038】

上記の血小板から放出される物質とは、具体的には、ATP、ADP、コラーゲン、トロンビン等が挙げられる。

当該血小板から放出される物質は、下記の工程：

- (1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、フィルターからの通過画分を得る工程；
  - (2) (1) で得られた通過画分を、血小板を吸着し、赤血球を通過させる第2段フィルターに通し、血小板が吸着したフィルターを得る工程；
  - (3) (2) で得られたフィルターに、血小板活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質の含有液を得る工程；
- を含む方法によって得られる。

この工程(1)で用いる第1段フィルターの例としては、WO01/32236号公報等に記載のフィルターなどが挙げられる。また、工程(2)で用いる第2段フィルターの例としては、特公平2-13587号公報等に記載のフィルター等が挙げられる。

#### 【0039】

ここで、血小板活性化物質とは、ATP、ADP、エピネフリン、コラーゲン、トロンビン、トリプシンやラテックス粒子等を言う。また、血小板活性化物質を含む回収液とは、これらの血小板活性化物質を生理食塩水、燐酸緩衝液等の適当な緩衝液、アルブミン溶液あるいはこれらの混合液に溶解したものを言い、血小板活性化物質を含む回収液は、血小板を上記血小板活性化物質と接触させることにより得ることができる。

#### 【0040】

一方、上記の白血球から放出される物質は、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化白血球物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られることできる。

#### 【0041】

ここで、白血球活性化物質とは、白血球自身に含まれていて白血球の増殖・分化・接着・遊走能等を刺激する活性を有する物質（例えば fMLP ペプチド、TNF、IL-1、IL-6 等のサイトカイン）あるいは抗T細胞抗体などが挙げられる。白血球活性化物質を含む回収液は、界面活性剤・適当な緩衝液・低張液との接触や、白血球の物理的破壊等により得ることができる。

#### 【0042】

さらに、血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物は、下記の工程：

(1) 赤血球と血漿を通過させ、血小板と白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、血小板と白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、血小板活性化物質と白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質と活性化白血球放出物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られる。

工程(1) で用いる第1段フィルターの例としては、特公平2-13587号公報等に記載のフィルター等が挙げられる。

#### 【0043】

上記の各操作に用いるフィルターは、例えば、不織布型（平板状の積層型あるいは円筒状の積層型）、中空膜糸型、多孔質膜型のフィルター等が好適である。白血球除去・血小板通過フィルター（W001/32236号公報等）、白血球、血小板除去フィルター（特公平H02-13587号公報等）など公知の分離フィルターを用いればよい。



また、こうして得られた血小板から放出される物質、および白血球から放出される物質はフィブリン糊を足場材としない再生医療にも、分化、増殖の刺激剤としても用いることができる。

#### 【0044】

後記実施例に示されるように、本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、損傷治癒過程に関与する血管内皮細胞に対する増殖活性に優れていることから損傷治癒に有効である。

また、本発明のフィブリン含有生物学的足場材は損傷治癒過程に関与する繊維芽細胞に対する接着能及び遊走活性に有することから、損傷治癒に有効である。

#### 【0045】

また、本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、骨芽細胞、軟骨、脂肪細胞等に分化する骨髄間葉系幹細胞に対する増殖活性に優れていることから、人工骨、人工皮膚、人工臓器などの形成において有用である。

さらに、本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、ヒト初代肝実質細胞に対する増殖活性を有することから、肝移植手術、アルブミン大量生産、薬物代謝研究に有用である。

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。

#### 【0046】

##### 【実施例】

実施例1 (改良クリオ法によるフィブリンノーゲン濃縮物の調製及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

健康人より得た新鮮血400ml [抗凝固剤として56mlのCPD (Citrate-phosphate-dextrose; SIGMA社製C7165) を添加] を、50ml用遠心チューブ (日本ベクトンディキンソン社製No. 352070) に分注し、遠心分離 (1,000g×15分、4℃) (KUBOTA社製3740) にて血漿235mlを得た。これをフリーザー (EEV-204N Whirlpool社製) に移し、-27℃にて30分間静置して凍結させた。次に血漿の入った遠心チューブを、チャンバー温度を-2.5℃に設定した冷却遠心機 (KUBOTA社製3740) 内に移して30分間放置した。続いて予めチャンバーの温度を12℃に設定した別の冷却遠心

機に遠心チューブを移し、30分間放置した。その後、冷蔵庫内(SANYO社製 Medicoool MPR-510、4℃)に30分間静置した。最後に遠心分離(1000g×15分、1℃)を行い、上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得た。

#### 【0047】

フィブリノーゲンの定量は免疫学的方法に基づく市販のフィブリノーゲン測定キット(コスモバイオ社製FG-EIAキット)を用い、測定手順はメーカー添付の手順書に従った。回収したフィブリノーゲン量は40.2mgであった。原料とした血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は198mgであり、回収率は20.3% ( $40.2/198 \times 100 = 20.3$ )であった。フィブリノーゲン濃縮物と、50mM 塩化カルシウム(Sigma社製C5080)を含むヒト血漿トロンビン溶液(Sigma社製T8885) (5NIH units/ml)とを素早く等量混合し、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

#### 【0048】

実施例2(改良クリオ法(別法)によるフィブリノーゲン濃縮物の調製及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

健康人より得た新鮮血40ml[抗凝固剤として5.6mlのCPD(Citrate-phosphate-dextrose; SIGMA社製C7165)を添加]を、50ml用遠心チューブ(日本ベクトンディキンソン社製No.352070)に集め、遠心分離(1,000g×15分、4℃)(KUBOTA社製3740)により血漿20.5mlを得た。これをフリーザー(EEV-204N Whirlpool社製)に移し、-30℃にて60分間静置して凍結させた。次に血漿の入った遠心チューブを、チャンバー温度を-5℃に設定した冷却遠心機(KUBOTA社製3740)内に30分間放置した。その後、冷蔵庫内(SANYO社製 Medicoool MPR-510、4℃)に30分間静置した。最後に遠心分離(1000g×15分、1℃)を行い、上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得た。回収したフィブリノーゲン量は7.1mgであった。原料とした血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は24.8mgであり、回収率は28.6% ( $7.1/24.8 \times 100 = 28.6$ )であった。フィブリノーゲン濃縮物と、50mM 塩化カルシウム(Sigma社製C5080)を含むヒト血漿トロンビン溶液(Sigma社製T8885) (5NIH units/ml)とを素早く等量混合し、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

#### 【0049】

比較例 1 (クリオ法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

クリオ法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製は、Casaliらの方法に従った (Transmission, 32, 641-643, 1992)。

健常人より得た新鮮血40ml [抗凝固剤として5.6mlのCPD (Citrate-phosphate-dextrose; SIGMA社製C7165) を添加] を、50ml用遠心チューブ (日本ベクトンディキンソン社製No. 352070) に集め、遠心分離 (1,000×15分、4℃) (KUBOTA社製3740) にて血漿22.5mlを得た。これを超低温フリーザー (MDF-293 SANYO社製) に移し、-80℃にて18時間凍結させた。次に、4℃に設定された冷蔵庫 (MPR-311 SANYO社製) 内に移して16時間放置し、緩速解凍した。次に、冷却遠心機にて1000g×15分間遠心分離を行った (4℃)。形成された沈殿物を乱さぬように注意しながら、上記条件に従って再度凍結及び解凍を繰り返した。解凍後、再び4℃にて1000g×15分間遠心分離を行い、沈殿物を回収し、フィブリノーゲン濃縮物とした。回収したフィブリノーゲン量は8.7mg、元の血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は21.5mgであり、回収率は40.5% ( $8.7/21.5 \times 100 = 40.5$ ) であった。フィブリノーゲン濃縮物と、50mM 塩化カルシウム (Sigma社製C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma社製T8885) (5NIH units/ml) とを素早く等量混合し、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

【0050】

比較例 2 (エタノール法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

エタノール法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製は、Kjaergardの方法に従った (Surg Gynecol Obstet, 175(1), July, 1992)。

健常人より得た新鮮血40ml [抗凝固剤として5.6mlのCPD (Citrate-phosphate-dextrose; SIGMA社製C7165) を添加] を、50ml用遠心チューブ (日本ベクトンディキンソン社製No. 352070) に入れ、600×g、10分間の遠心分離 (KUBOTA社製3740) をを行い、血漿を得た。この血漿を新しい50ml用遠心チューブに移し、30分間かけて氷水上 (0℃) で2.5mlのエタノール (99.5% 和光純薬株式会社製) を時々攪拌しながら添加することにより、フィブリノーゲンを沈澱させた。600×g、15分

間の遠心分離によりフィブリノーゲン沈澱物を回収し、フィブリノーゲン濃縮物とした。回収したフィブリノーゲン量は3.6mg、元の血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は21.5mgであり、回収率は12.65% ( $2.7/21.5 \times 100 = 12.65$ )であった。使用まで-85℃で貯蔵した。使用前にフィブリノーゲン濃縮物を37℃で溶解し、0.3容の80mM 塩化カルシウム (Sigma社製C5080)を含むヒト血漿トロンビン溶液(Sigma社製T8885) (5NIH units/ml) を素早く混合することにより、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

#### 【0051】

試験例1 (血管内皮細胞(正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)に対する増殖刺激活性)

実施例1で調製したフィブリン含有生物学的足場材0.5mlを24ウェルマルチプレート(日本ベクトンディキンソン社製No. 353047)上に添加し、すばやくプレート全体に行き渡るように攪拌し、プレート底面に均一な生物学的足場材を作製した(n=3)。20分後、プレート底面をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mMグルタミン、2%ウシ胎仔血清を含むD-MEM培地(インビトロジェン社製)に懸濁させた2×10<sup>4</sup>個の正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC; タカラバイオ株式会社製C2517)を添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>濃度の炭酸ガスインキュベータ(SANYO社製MCO-345)にて72時間培養した。培養後、あらかじめ37℃に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液で非付着細胞を洗浄除去した。0.05%ディスパーゼ溶液(日本ベクトンディキンソン社製354235)1mlを各ウェルに添加し、プレートを37℃、炭酸ガスインキュベータ内にて静置した。30分後、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を回収し、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes社製)を用いて、メーカー添付の手順書に従い、同時に調製したHUVECの検量線より、細胞数を計測した。実施例1で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞数は、 $12.5 \pm 0.3 \times 10^4$ 個であった(n=3の平均値±標準偏差)。これは後述する比較例1に記載するように、回収率40.5%のフィブリノーゲン組成物を用いたフィブリン含有生物学的足場材上で培養した場合よりも有意に増加していた。

#### 【0052】

同様に実施例2で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する増殖刺激活性を測定したところ、 $8.4 \pm 0.3 \times 10^4$ 個

であった ( $n=3$ の平均値±標準偏差)。

同様に比較例 1 で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する増殖刺激活性を測定したところ、 $6.3 \pm 0.2 \times 10^4$ 個であった ( $n=3$ の平均値±標準偏差)。

同様に比較例 2 で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する増殖刺激活性を測定したところ、 $4.1 \pm 0.2 \times 10^4$ 個であった ( $n=3$ の平均値±標準偏差)。

#### 【0053】

実施例 1 及び 2、並びに比較例 1 及び 2 で得られたフィブリノーゲン濃縮物におけるフィブリノーゲン回収率及び各フィブリノーゲン濃縮物を用いて調製したフィブリン含有生物学的足場材の血管内皮細胞 (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞) に対する増殖刺激活性を下記表 1 にまとめた。

#### 【0054】

【表 1】

	フィブリノーゲン回収率 (%)	血管内皮細胞増殖活性 (細胞数: $\times 10^4$ cells)
実施例 1	20.3	$12.5 \pm 0.3$
実施例 2	28.6	$8.4 \pm 0.3$
比較例 1	40.5	$6.3 \pm 0.2$
比較例 2	12.5	$4.1 \pm 0.2$

#### 【0055】

##### 試験例 2 (繊維芽細胞の接着能)

実施例 1 で作製した生物学的足場材の繊維芽細胞に対する接着能を検討した。実施例 1 で作製したフィブリノーゲン濃縮物 0.5ml と、50mM 塩化カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) ( $5 \text{ NIH units/ml}$ ) とを素早く等量混合し、24 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353047) 上にフィブリン含有生物学的足場材作製した ( $n=3$ )。20 分後、フィブリン含有生物学的足場材をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mM グルタミン、2% ウシ胎仔血清を含む D-MEM 培地 (インビトロ社製) に懸濁させた  $2 \times 10^4$  個の正常ヒト

皮膚繊維芽細胞（タカラバイオ社製 NHDF-Neo）を入れ、37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温槽にて60分間インキュベートした。60分後、インキュベータから取り出し、あらかじめ37℃に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液でプレートを洗浄し、付着細胞をメタノールにて固定後、Giemsa染色を行い、光学顕微鏡にて検鏡した。実施例1で作製した生物学的足場材上に十分伸展している繊維芽細胞が接着していることが確認された。

#### 【0056】

##### 試験例3（繊維芽細胞に対する遊走能）

実施例1で作製した生物学的足場材の繊維芽細胞に対する遊走能を検討した。実施例1で作製したフィブリノーゲン濃縮物0.5mlと、50mM塩化カルシウム（Sigma社製C5080）を含むヒト血漿トロンビン溶液（Sigma社製T8885）（5NIH units/ml）とを素早く等量混合し、24ウェルマルチプレート（日本ベクトンディキンソン社製No. 353047）上にフィブリン含有生物学的足場材を作製した（n=3）。20分後、フィブリン含有生物学的足場材をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、24ウェルマルチプレート（日本ベクトンディキンソン社製No. 353047）の底部に、フィブリン含有生物学的足場材を形成させた。4mMグルタミン、2%ウシ胎仔血清を含むD-MEM培地（インビトロジェン社製）を加え、コラーゲンコートしたフィルターを装備した遊走能測定用チャンバー（日本ベクトンディキンソン社製No. 353431）をプレートに載せ、 $2 \times 10^4$ 個の正常ヒト皮膚繊維芽細胞（タカラバイオ株式会社製NHDF-Neo）を添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温槽にてインキュベートした。2時間後、膜の裏側に遊走した細胞をGiemsa染色後に顕微鏡下に観察した。実施例1で作製した生物学的足場材は強い遊走能を示した。

#### 【0057】

##### 試験例4（骨髄間葉系幹細胞に対する増殖刺激活性）

実施例1で作製した生物学的足場材の骨髄間葉系幹細胞に対する増殖活性を検討した。実施例1で作製したフィブリノーゲン濃縮物0.5mlと、50mM塩化カルシウム（Sigma社製C5080）を含むヒト血漿トロンビン溶液（Sigma社製T8885）（5NIH units/ml）とを素早く等量混合し、24ウェルマルチプレート（日本ベクトンディキンソン社製No. 353047）上に添加し、すばやくプレート全体に行き渡るように攪拌し

、プレート底面に均一な足場材を作製した。次に、プレート底面をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mMグルタミン、2%ウシ胎仔血清を含むD-MEM培地（インビトロジェン社製）に懸濁させた $2 \times 10^4$ 個の正常ヒト骨髓間葉系幹細胞（タカラバイオ株式会社製PT034）を添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>濃度の炭酸ガスインキュベータにて72時間培養した。対照として同数の骨髓間葉系幹細胞を足場材のないプレートに培養したものをを用いた。培養後、予め37℃に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液で死滅細胞を洗浄除去した。0.05%ディスパーゼ溶液1mlを各ウェルに添加し、37℃にて炭酸ガスインキュベータ内で静置した。30分後、骨髓間葉系幹細胞を回収し、メーカー添付の手順書に従い、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes社製)を用いて、同時に調製した骨髓間葉系幹細胞の検量線より細胞数計測した。実施例1で作製した生物学的足場材は、対照である足場材のないプレートと比較して、ヒト骨髓間葉系幹細胞に対する高い増殖活性を示した。

#### 【0058】

##### 試験例5（ヒト初代肝実質細胞に対する増殖刺激活性）

実施例1で作製した生物学的足場材ヒト初代肝実質細胞に対する増殖活性を検討した。実施例1で作製したフィブリノーゲン濃縮物0.5mlと、50mM塩化カルシウム（Sigma社製C5080）を含むヒト血漿トロンビン溶液（Sigma社製T8885）（5NIH units/ml）とを素早く等量混合し、24ウェルマルチプレート（日本ベクトンディキンソン社製No. 353047）上に添加し、すばやくプレート全体に行き渡るように攪拌し、プレート底面に均一な足場材を作製した。次に、プレート底面をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mMグルタミン、2%ウシ胎仔血清を含むD-MEM培地（インビトロジェン社製）に懸濁させた $2 \times 10^4$ 個の正常ヒト肝細胞（タカラバイオ株式会社製C2591）を添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>濃度の炭酸ガスインキュベータにて72時間培養した。対照として同数の正常ヒト肝細胞を足場材のないプレートに培養したものをを用いた。培養後、予め37℃に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液で非付着細胞を洗浄除去した。0.05%ディスパーゼ溶液1mlを各ウェルに添加し、37℃にて炭酸ガスインキュベータ内で静置した。30分後、肝実質細胞を回収し、メーカー添付の手順書に従い、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes社製)を用いて細胞数を計測した。実施例1で作製した生物学的足場材は、対照で

ある足場材のないプレートと比較して、ヒト肝実質細胞に対する高い増殖活性を示した。

【0059】

【発明の効果】

本発明により、再生医療分野において細胞増殖・分化を行うのに適した性能のよい足場材を提供することが可能になった。本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、血管内皮細胞、骨髓間葉系幹細胞及びヒト初代肝実質細胞に対する増殖活性を有し、また繊維芽細胞に対する接着能及び遊走活性に有することから、損傷治癒、人工骨、人工皮膚又は人工臓器などの形成、肝移植手術、アルブミン大量生産、薬物代謝研究などに有用である。



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 再生医療分野において細胞増殖・分化を行うのに適した性能のよい足場材を提供すること。

【解決手段】 フィブリノーゲン回収率が15%~32%の範囲になるように血漿から沈澱させて得られたフィブリノーゲン濃縮物と、フィブリノーゲン活性化物質との混合物を含む、フィブリン含有生物学的足場材。

【選択図】 なし

特願 2002-243923

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000116806]

1. 変更年月日

1990年 8月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区内幸町1丁目1番1号

氏 名

旭メディカル株式会社

2. 変更年月日

1998年 6月11日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都千代田区神田美土代町9番地1

氏 名

旭メディカル株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**